

磷脂酰甘油对缺钙光系统 II 放氧活性的影响

阳振乐 李良璧 许亦农 匡廷云

(中国科学院植物研究所光合作用研究中心, 北京 100093. Email: yangzhl@public.fhnet.cn.net)

摘要 磷脂酰甘油 (PG) 对缺钙光系统 II (d_{Ca} PS II) 的放氧活性具有显著的影响, 即 PG 可以使 PS II 颗粒因缺钙而受抑制的放氧活性得到恢复. 外加 Ca^{2+} 可使 PG 表现出对 d_{Ca} PS II 放氧活性的更大促进作用, 且随 Ca^{2+} 浓度的增加, 促进作用也越显著. PG 的作用就在于恢复蛋白的正常结构, 而 PG 与 Ca^{2+} 形成的配合物可以优化这种结构而使缺钙 PS II 颗粒的放氧活性得到增强.

关键词 缺钙光系统 II 磷脂酰甘油 钙离子 放氧活性

光系统 II (PS II) 是光合作用中发生放氧反应(即水氧化裂解成氧气的过程)的完整功能单位, 包含了一系列与光合放氧有关的内周蛋白和外周蛋白, 其中内周蛋白有 D1 和 D2 蛋白、细胞色素 Cyt b_{559} 、两个核心天线蛋白或称 Chl a 结合蛋白 CP43 和 CP47, 外周蛋白包括捕光色素蛋白复合体(LHC II), 3 个水溶性蛋白 33, 24 和 17 ku 以及其他的一些低分子量蛋白^[1~4]. 除了这些蛋白外, PS II 还包含了水裂解反应的必要组分, 如由 4 个锰原子组成的锰簇以及光合放氧的重要辅助因子 Ca^{2+} , Cl^- 等^[5~7].

大量实验表明, PS II 中的 Ca^{2+} 与 PS II 的放氧能力密切相关^[6, 8]. 但对于钙离子在 PS II 放氧过程中的具体作用机制以及钙离子在 PS II 中的结合位点, 至今还缺乏统一的认识. 许多研究认为钙离子的许多配体来自于 D1 和 D2 蛋白. 但也有研究认为 Chl a 结合蛋白 CP43, CP47 和细胞色素 Cyt b_{559} 的酸性或亲水性氨基酸残基如天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)或组氨酸(His)残基适合成为 Ca^{2+} 的配体; 此外, 33 和 24 ku 也有参与 Ca^{2+} 结合的可能性. 有意思的是, Yocum^[8] 还认为某些膜的极性基团也有可能是 Ca^{2+} 的潜在配体.

越来越多的事实表明, 类囊体膜上的膜脂不仅仅在于构成膜双层的基本骨架, 还与光合系统的某些功能有关, 或者其本身参与了一些光物理、光化学反应过程^[9, 10], 例如在 PS II 中所进行的电荷分离^[11]或电子传递^[12]都依赖于某些磷脂如磷脂酰甘油(phosphatidylglycerol, PG)的存在.

PG 是光合膜中含量较多的磷脂, 占总膜脂的 5%~15%^[9, 10]. 自从 1958 年被 Benson 等人^[13]首次发现以来, PG 一直成为人们的研究对象, 时至今日仍然如此. 但对于 PG 在光合系统中的功能与结构的关系, 迄今为止还缺乏本质上的认识. 有一些实验也似乎表明, 在光合系统中存在着 PG 与蛋白之间的特异结合, PG 起着不可替代的作用. Nußberger 等人^[14]通过对 LHC II 的研究, 揭示了 PG 是维持 LHC II 的寡聚体结构所必需的. Siegenthaler 等人^[12]的结果表明在类囊体膜的内层膜中存在着一个与电子传递有关的 PG 区. Murata 等人^[15]仔细分析了光合系统中从类囊体到 PS II 反应中心各种功能单位的膜脂种类及其组成, 结果发现了 PG 与 PS II 核心复合物之间的特异结合, PG 与 P680 的摩尔数之比为 4/1. Kruse 等人^[16]进一步认为 PG 的结合位点存在于 D1 蛋白, PG 分子的作用就在于使 D1 蛋白维持着适宜的结构得以完成正常的功能. 这暗示出 D1 蛋白的活性依赖于 PG, 这是因为没有 PG 的存在, D1 蛋白就难以保持其正常的结构. 由此也不难理解, 这会进一步影响到与 D1 蛋白结合的锰簇或一些芳香簇氨基酸

残基以及反应中心色素分子如 P680、去镁叶绿素 Pheo 等。

我们以前的研究表明^[17], PG 具有增强 PS II 颗粒放氧活性的作用。本研究工作试图通过膜脂对缺钙 PS II 放氧活性的影响进一步探讨膜脂的作用。首先, 我们观察与分析了 Ca^{2+} 对缺钙 PS II 放氧活性的影响; 其次, 研究了 PG 以及在 Ca^{2+} 存在下 PG 对缺钙 PS II 的作用。本文的研究结果显示, PG 不仅能促进 PS II 的放氧活性, 还对 PS II 系统表现出新的作用, 即能基本恢复 PS II 因缺钙而降低的放氧反应能力。

1 材料与方法

(i) 材料。磷脂酰甘油(PG)为分析纯(>99%), Sigma 公司产品。菠菜(*Spinacia oleracea* L)购自当地市场。

(ii) PS II 颗粒的制备。参照 Berthold 等人^[18]的方法加以分离、纯化, 稍加改进: 第 1 次用 Triton X-100 处理时改在 pH = 6.0 介质中进行, 并省去第 2 次 Triton X-100 处理。所得提取物用缓冲液 (0.4 mol/L Sucrose, 10 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Mes-NaOH, pH = 6.5) 洗 2~3 次, 并以此缓冲液悬浮备用。PS II 颗粒中的色素浓度按照 Arnon^[19]的方法测定。

(iii) 缺钙 PS II 颗粒的制备。依照 Ono 等人^[20]的方法进行处理: 将 PS II 颗粒用 pH = 3.0 缓冲液 (0.4 mol/L Sucrose, 10 mmol/L NaCl, 10 mmol/L citrate-NaOH) 暗中悬浮 5 min, 然后以 10 倍体积的 pH = 6.5 缓冲液 (0.4 mol/L Sucrose, 10 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Mes-NaOH) 将 pH 值调至 6.5, 用该缓冲液洗 2~3 次, 并以此缓冲液悬浮备用。

(iv) 缺钙 PS II~PG 复合物 (d_{Ca} PS II~PG)的制备。将 PG 溶解在适量的氯仿中, 然后用氮气吹干。加入一定量的缓冲液 (0.4 mol/L Sucrose, 10 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Mes-NaOH, pH = 6.5), 超声处理 15 min 以上。将缺钙 PS II 按照一定的比例 (在本文中为 10 mg PG/ mg Chl) 加入到上述脂质体溶液中, 暗中冰浴下静置 0.5 h 左右。

(v) 钙的添加。在冰水浴下向各种含 PS II 样品中加入一定浓度的 CaCl_2 溶液, 并静置 15 min 后进行放氧活性的测定。

(vi) 放氧活性测定。采用 Clark 型氧电极, 用极谱法在饱和光强下测定体系的放氧活性。所测样品浓度为 10 μg Chl/mL, 介质为 0.4 mol/L Sucrose, 10 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Mes-NaOH 缓冲液 (pH = 6.5), 以 1.0 mmol/L 二甲基苯醌 (DMBQ) 为电子受体。

2 结果

用低 pH 值 (柠檬酸钠缓冲液, pH = 3.0) 的方法对 PS II 进行去钙处理, 对 PS II 颗粒的放氧活性产生显著影响。在 pH = 6.5 条件下, PS II 颗粒的放氧活性大致在 120 $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chl} \cdot \text{h}^{-1}$ 左右, 但经过去钙处理后, 其放氧活性降低至 27.6 $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chl} \cdot \text{h}^{-1}$ (表 1), 仅为对照样品的 23% (图 1)。

添加 CaCl_2 可使 d_{Ca} PS II 颗粒的放氧能力得到提高, 例如在 5 mmol/L 的 CaCl_2 存在下, d_{Ca} PS II 的放氧活性由 27.6 $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chl} \cdot \text{h}^{-1}$ 增加至 102 $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chl} \cdot \text{h}^{-1}$, 增加了近 2.7 倍。表 1 的结果也显示出, 尽管不同浓度的 CaCl_2 都能促进 d_{Ca} PS II 的放氧活性, 但并不能使 d_{Ca} PS II 恢复至 PS II 的正常水平 (120 $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chl} \cdot \text{h}^{-1}$), 即使 CaCl_2 的浓度较高时也是如此。相反, 高浓度的 CaCl_2 对 d_{Ca} PS II 放氧活性的促进作用反而比低浓度的 CaCl_2 要有所减弱。

表 1 各种 PS II 颗粒在不同浓度 CaCl₂ 存在下的放氧活性

CaCl ₂ 浓度/mmol · L ⁻¹	放氧活性/ $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chl} \cdot \text{h}^{-1}$		
	PS II	d _{Ca} PS II	d _{Ca} PS II ~PG
0	120.0	27.6	108.0
2	144.0	85.0	150.0
4	159.6	96.0	168.0
5	162.0	102.0	177.6
6	160.8	99.6	186.0
8	158.4	94.8	190.8
10	154.8	90.0	195.6
15	147.6	87.6	202.8
20	138.0	84.0	203.0

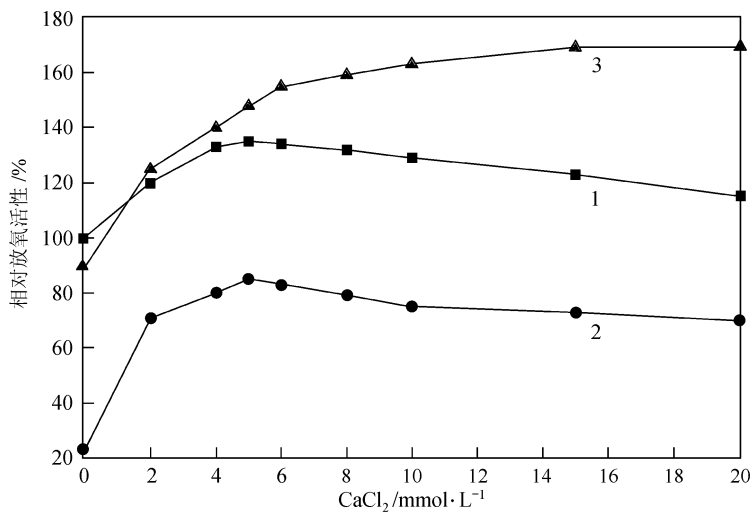


图 1 CaCl₂ 对各种 PS II 颗粒放氧活性的影响

1 为 PS II; 2 为 d_{Ca}PS II; 3 为 d_{Ca}PS II ~PG (10 mg PG/mg Chl). 100%代表 PS II 颗粒的放氧活性, 即 120 $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chl} \cdot \text{h}^{-1}$

有意思的是, 磷脂 PG 也能促进 d_{Ca}PS II 的放氧活性, 表 1 中的有关数据清楚地表明了这一点. 在本工作中, PG 与 d_{Ca}PS II 之间的比例保持在 10 mg PG/mg Chl 左右. PG 的存在能使 d_{Ca}PS II 的放氧速率由 27.6 $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chl} \cdot \text{h}^{-1}$ 迅速提高至 108 $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chl} \cdot \text{h}^{-1}$, 增加了 300%左右, 比 CaCl₂ 的促进作用还要大. 结果似乎表明 PG 可代替 Ca²⁺ 的作用, 但很显然 PG 和 CaCl₂ 对 d_{Ca}PS II 颗粒存在着不同的作用方式. 不过上述结果也反映出, 虽然 PG 能将 d_{Ca}PS II 的放氧活性提高到较高的水平, 但仍然不能使 PS II 颗粒因缺钙而丧失的放氧活性得到完全恢复.

但在 CaCl₂ 的存在下, 情况却有很大的变化, 表 1 和图 1 中的曲线 3 反映出了不同浓度的 CaCl₂ 对 d_{Ca}PS II ~PG 复合物放氧反应的影响. 从表 1 和图 1 可以看出, 有 CaCl₂ 存在时, d_{Ca}PS II ~PG 表现出更强的放氧能力, 甚至比 PS II 颗粒还要强. 例如, 外加 5 mmol/L CaCl₂ 可使 d_{Ca}PS II ~PG

放氧能力由 $108 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chl} \cdot \text{h}^{-1}$ 提高至 $177.6 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chl} \cdot \text{h}^{-1}$, 远大于在同样条件下 $d_{\text{Ca}}\text{PS II}$ 颗粒的放氧活性 ($102.0 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chl} \cdot \text{h}^{-1}$), 也强于 PS II 颗粒 ($162.0 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{Chl} \cdot \text{h}^{-1}$). 上述结果意味着 PG 与 CaCl_2 之间可能存在着协同效应.

3 讨论

Ca^{2+} 是光合放氧过程中比较重要的辅助因子^[6, 8]. 在 PS II 中去除 Ca^{2+} 可使其放氧活性降低 80% 左右; Ca^{2+} 也可以使 PS II 因 24 和 17 ku 蛋白丧失而下降的放氧活性得到恢复. 此外 Ca^{2+} 还能稳定锰复合物的配体, 并且能防止锰复合物被还原剂如 NH_2OH 等的还原而遭到破坏. PS II 缺乏 Ca^{2+} 时, 会导致 Kok 循环 ($S_0 \rightarrow S_4$) 中断, 使之只能发生 $S_0 \rightarrow S_1$, $S_1 \rightarrow S_2$ 两个过程, 而 $S_2 \rightarrow S_3$ 过程受阻.

一般认为, 每个 PS II 反应中心含有 2~3 个 Ca^{2+} , 其中一个具高亲和性, 结合得较为紧密, 另外 1~2 个亲和性低, 结合较为松散^[6, 8]. 用 $\text{pH} = 3.0$ 的柠檬酸钠缓冲液对 PS II 进行去钙处理, 只能除去松散结合的 Ca^{2+} . 本文中 Ca^{2+} 的去除导致 PS II 颗粒的放氧活性减少了 77%, 与文献^[19]报道的相似. 图 1 和表 1 的结果表明, 外加 Ca^{2+} 可使 PS II 放氧活性有所恢复, 但并不完全. Ca^{2+} 重组至原来的结合位点上被认为是 $d_{\text{Ca}}\text{PS II}$ 放氧活性提高的原因^[6, 8].

在这里, 还必须考虑 Cl^- 的影响. Cl^- 与 Ca^{2+} 一样, 在光合放氧过程中起着重要的作用, 将 PS II 进行去 Cl^- 处理, 将会导致放氧活性的丧失. 但有报道^[21]指出, 外加的 Cl^- , 远在低浓度如 0.3 mmol/L 就会抑制 PS II 的放氧活性, 而在我们的工作中 Cl^- 的浓度都要远远大于 0.3 mmol/L , 因此本文中 CaCl_2 对 $d_{\text{Ca}}\text{PS II}$ 放氧活性所表现出来的促进作用, 应是 Ca^{2+} 所致.

同时我们还注意到, 我们加入的 Ca^{2+} 浓度都要远超过 PS II 放氧反应所需要的数值, 这是因为在通常的 PS II 中每个反应中心含有 2~3 个 Ca^{2+} , 即每摩尔 P680 含 2~3 mol Ca^{2+} . 在色素浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$ 的溶液中, 当加入 CaCl_2 的浓度在 $2\sim 20 \text{ mmol/L}$ 时, 则 Ca^{2+} 与 P680 的比例为 $10\sim 100$ (摩尔比) (在放氧核心复合物中, 每摩尔 P680 含 Chl 50 mol^[22]). 由此可以看出, 在 $d_{\text{Ca}}\text{PS II}$ 中加入的 Ca^{2+} , 大部分有着其他的作用. 至于这种作用的具体机制, 是个值得研究的问题.

在本工作中, 我们还首次发现了磷脂 PG 对 PS II 系统所起的新作用, 即 PG 可使 PS II 颗粒因缺钙而受抑制的放氧活性得到基本恢复, 在本文中能将缺钙 PS II 颗粒的放氧能力由 23% 提高至 90% (以 PS II 颗粒的放氧活性为基准, 下同), 接近于完整 PS II 颗粒的水平, 表明了 PG 对缺钙的补偿效应. 一般认为^[23], 低亲和性 Ca^{2+} 的作用在于维持不同蛋白间的结合并由此形成适合水裂解的微环境. 去除 Ca^{2+} 将破坏蛋白的正常结构并进而影响水裂解的微环境, 因此表现出放氧活性的丧失. 由此看来, PG 对缺钙的补偿效应应是一种对蛋白结构的影响, 即, 使因缺钙而改变的蛋白结构恢复至近于正常的状态. 由于 PG 与 Ca^{2+} 是两种不同性质的离子, 且电性相反, 因此 PG 与 Ca^{2+} 具有不同的作用方式.

而在有 Ca^{2+} 存在时, PG 更表现出对 $d_{\text{Ca}}\text{PS II}$ 放氧活性的极大促进作用, 且随浓度的增加, 促进作用愈加显著. 例如, 当 Ca^{2+} 浓度为 20 mmol/L 时, PG 的作用使 $d_{\text{Ca}}\text{PS II}$ 的放氧活性高达约 170%, 而无 PG 作用时, $d_{\text{Ca}}\text{PS II}$ 的放氧活性只有 70%. 上述结果清楚地表明, 在 PG 与 Ca^{2+} 之间存在着明显的协同作用. 近来的研究显示^[24], Mg^{2+} 可以在脂-蛋白的界面与 PG 的磷酸根 PO_2^- 形成配合物, 而这种结构的形成能优化 PS II 的功能. 本工作中 PG 和 Ca^{2+} 对缺钙 PS II 放氧活性所表现出来的协同作用似可归之于这种 PG 与 Ca^{2+} 之间的配合物的形成, 但尚需做进

一步的研究.

有报道指出^[2], 外周蛋白 24 或 17 ku 是调节低亲和性 Ca^{2+} 与光合放氧复合物结合的主要因素, 联系我们的研究结果, 即 PG 对缺钙的补偿效应以及 PG 与 Ca^{2+} 之间存在的协同作用, 由此不难看出, PG 的作用部位很可能就在 24 或 17 ku 蛋白的附近.

综上所述, PS II 颗粒因缺钙而丧失的放氧活性可由 PG 的作用而得到恢复, PG 的作用就在于恢复蛋白的正常结构, 而 PG 与 Ca^{2+} 形成的配合物可以优化这种结构而使缺钙 PS II 颗粒的放氧活性得到增强.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号: 39890390)和国家重点基础研究发展规划基金(批准号: G1998010100) 资助项目.

参 考 文 献

- 1 Ort D R, Yocum C F, eds. Oxygenic Photosynthesis: the Light Reaction. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1996
- 2 Hankamer B, Barber J, Boekema E J. Structure and membrane organization of photosystem II in green plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1997, 48: 641~671
- 3 Nugent J H A. Oxygenic photosynthesis electron transfer in photosystem I and photosystem II. Eur J Biochem, 1996, 237: 5119~5131
- 4 Barber J, Andersson B. Revealing the blueprint of photosynthesis. Nature, 1994, 370: 31~34
- 5 Yachandra V K, Sauer K, Klein M P. Manganese cluster in photosynthesis: where plants oxidize water to dioxygen. Chem Rev, 1996, 967: 2927~2950
- 6 Debus R J. The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution. Biochim Biophys Acta, 1992, 1102: 269~352
- 7 Van Vliet P, Rutherford A W. Properties of the chloride-depleted oxygen-evolving complex of photosystem II studied by electron paramagnetic resonance. Biochemistry, 1996, 35: 1829~1839
- 8 Yocum C F. Calcium activation of photosynthetic water oxidation. Biochim Biophys Acta, 1991, 1059: 1~15
- 9 Webb M S, Green B R. Biochemical and biophysical properties of thylakoid acyl lipids. Biochim Biophys Acta, 1991, 1060: 133~158
- 10 Siegenthaler P A, Murata M, eds. Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1998
- 11 Jordan B R, Chow W S, Baker A J. The role of phospholipids in the molecular organization of pea chloroplast membranes. Effect of depletion on photosynthetic activities. Biochim Biophys Acta, 1983, 725: 77~86
- 12 Siegenthaler P A, Rawlyer A, Smutny J. The phospholipid population which sustains the uncoupled non-cyclic electron flow activity is localized in the inner monolayer of the thylakoid membrane. Biochim Biophys Acta, 1989, 975: 104~111
- 13 Benson A A, Maruo B. Plant phospholipids. I. Identification of the phosphatidylglycerols. Biochim Biophys Acta, 1958, 27: 189
- 14 Nußberger S, Dörr K, Wang D N, et al. Lipid-protein interaction in crystals of plant light-harvesting complex. J Mol Biol, 1993, 224: 347~356
- 15 Murata M, Higashi S, Fujimura Y. Glycerolipids in various preparations of photosystem II from spinach chloroplasts. Biochim Biophys Acta, 1990, 1019: 261~268
- 16 Kruse O, Schmid G H. The role of phosphatidylglycerol as a functional effector and membrane anchor of the D1-core peptide from photosystem II particles of the cyanobacterium *Oscillatoria chalybea*. Z Naturforsch, Ser C, 1995, 50: 380~390
- 17 阳振乐, 李良璧, 许亦农, 等. 磷脂酰甘油对光系统 II 放氧活性的影响. 植物学报, 2000, 42(3): 249~252
- 18 Berthold D A, Babcock G T, Yocum C F. A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach

- thylakoid membranes. EPR and electron-transport properties. FEBS Lett, 1981, 134: 231~234
- 19 Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenyloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol, 1949, 14: 1~15
- 20 Ono T A, Inoue Y. Discrete extraction of the Ca atom functional for O₂ evolution in higher plant photosystem II by a simple low pH treatment. FEBS Lett, 1988, 227: 147~152
- 21 Nenonene E K, Methot M, Fragata M. Effect of MgCl₂ and phosphatidylglycerol on CaCl₂-mediated recovery of oxygen evolution in a photosystem II complex depleted of the 17 and 24 kDa extrinsic proteins. Z Naturforsch, 1998, 53c: 39~48
- 22 Murata N, Miyao M, Omata T, et al. Stoichiometry of components in the photosynthetic oxygen evolution system of photosystem II particles prepared with Triton X-100 from spinach chloroplasts. Biochim Biophys Acta, 1984, 765: 363~369
- 23 Noguchi T, Ono T A, Inoue Y. Direct detection of a carboxylate bridge between Mn and Ca²⁺ in the photosynthetic oxygen-evolving center by means of Fourier transform infrared spectroscopy. Biochim Biophys Acta, 1995, 1228: 189~200
- 24 Fragata M, Nenonene E K, Maire V, et al. Structure of the phosphatidylglycerol-photosystem II complex studied by FT-IR spectroscopy. Mg (II) effect on the polar head group of phosphatidylglycerol. J Mol Struct, 1997, 405: 151~158

(1999-09-01 收稿, 2000-01-19 收修改稿)